

• 短篇论著 •

肿瘤标志物质控血清的研制及其初步应用*

戴 卉¹, 钟志敏¹, 周小棉¹, 邹彩容², 柯方妮³, 汤美玲²

(1. 广州市第一人民医院检验科, 广州 510180; 2. 广州医学院, 广州 510182; 3. 中山医科大学, 广州 510080)

摘要:目的 研制一种可用于临床肿瘤标志物检测的液性质控血清。方法 利用冷冻血清在溶解过程中自然分层的原理, 用日常检测血清为原料, 30% 乙二醇(EG)作稳定剂, 制备肿瘤标志物[甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类蛋白 125(CA125)、CA153、CA199]高、低二水平, 以及前列腺特异性抗原(PSA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、 β -绒毛膜促性腺激素(β -HCG)、CA-724、CY2-11 高、中、低三水平的液性质控物, 以美国 BIO-RAD 公司的定值冻干质控物为对照, 对不同水平液性质控物血清的稳定性进行评价。结果 自制质控血清和 BIO-RAD 质控物检测结果比较, 二者呈正相关($P > 0.05$), 且变异系数 CV% 均小于 15%。结论 自行研制的液性质控血清具有时间稳定性良好, 重复性好, 成本低等优点, 有推广于临床应用的潜力。

关键词:液性质控物; 室内质控; 乙二醇; 血清

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)19-2557-02

Study of the home-made quality control serum for tumor markers and its application*

Dai Hui¹, Zhong Zhimin¹, Zhou Xiaomian¹, Zou Cairong², Ke Fangni³, Tang Meiling²

(1. Guangzhou First Municipal People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510180, China;

2. Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510182, China;

3. Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510180, China)

Abstract: Objective To explore and prepare liquid quality control serum for clinical examination of tumor makers. Methods Self-made quality control serum were prepared by using routine serum as the starting material, and 30% ethylene glycol(Ethylene Glycol, EG) as stabilizer under the natural stratification process of dissolution. Two levels of AFP, CEA, CA125, CA153, CA199 and three levels of T-PSA, NSE, β -HCG, CA-724, CY2-11 were produced in this study. The stability of self-made quality control serum were compared by lyophilized control material from BIO-RAD. Results Good correlation was found from the results of self-made quality control serum and BIO-RAD quality control ($P > 0.05$), the coefficient of variation was less than 15%. Conclusion From the results above, the self-made quality control serum has advantages of a time good stability, good repeatability, and low cost, which is the potential for clinical application.

Key words: liquid quality control material; internal quality; ethylene glycol; serum

国外有一些学者开始进行液性质控物稳定性的研究^[1], 国内也已有报道自制质控血清在临床生化检验和临床放射免疫检验中得到良好的验证和使用^[2-6]。但在电化学发光免疫方面的肿瘤标志物质控物研制则较少报道。因此建立一种制备便宜、简便的质控物方法和研制出性能稳定、价格低廉的液体质控血清用于电化学发光免疫有其重要的现实意义, 能减轻基层医疗单位的经济压力使质量控制工作真正落到实处。另外, 商品化质控品一般只有高、低两个水平, 如能自制一种稳定性高的中水平液体质控品, 则更可反映日常样品的检测浓度范围, 质量控制的效果将会更好。

本实验采用冷冻血清复溶过程中自然分层的原理建立一种简便、经济的质控血清制备方法, 利用废旧血清为原料, 选用 30% 乙二醇(ethylene glycol, EG)为稳定剂来制备肿瘤标志物液性质控物, 它具有与血清的性状一致、不需复溶、成本低廉等优点, 可作为室内质控物。

1 材料与方 法

1.1 仪器 Roche E170 电化学发光仪(德国罗氏公司), ACCESS2 全自动微粒子化学发光免疫分析系统(美国 Beckman coulter 公司)。

1.2 试剂与仪器 EG 为国产分析纯试剂。肿瘤标志物测定试剂采用德国罗氏诊断有限公司试剂, 相关批号: 甲胎蛋白(AFP) 15000202、15000203; 癌胚抗原(CEA) 15049501、

15049502; 糖类蛋白 125(CA125) 18128703; CA153 18207102; CA199 18065403; CA-724 15423602; CY2-11 15460501; 神经元特异性烯醇化酶(NSE) 15127002; 前列腺特异性抗原(PSA) 15166402。美国贝克曼库尔特有限公司试剂, 相关批号: β -绒毛膜促性腺激素(β -HCG) 827725。以 BIO-RAD 公司生产的“Lychocek Tumor Marker Control Level1 & Level2”冻干质控物中 AFP、CEA、CA125、CA153、CA199 的浓度, “Lychocek Tumor Marker Control Level1、Level2 & Level3”冻干质控物中 CA-724、CY2-11、PSA、NSE、 β -HCG 的浓度作为制备质控血清的参考标准。

1.3 液性质控物的制备 质控物制备方法参照文献[7]。具体方法为根据每日检验结果, 除黄疽、乳糜血、溶血和 HBsAg (+) 标本外, 收集当日送检标本的剩余阳性血清, 冷冻保存(-80℃)。当血清收集到一定量时, 于 4℃ 缓慢解冻、混匀, 过滤以去除血清中胶冻状的聚集物, 再行乙肝表面抗原、丙肝抗体和 HIV 抗体检测, 结果阴性后, 于 -20℃ 储存 2 周, 再于 4℃ 静置解冻 24 h, 勿摇动。高、低二水平质控物的制备: 小心取出容器中上 1/2 液体到另外的容器中, 将用于低水平质控物的制备; 剩下的 1/2 用于高水平质控物的制备。高、中、低三水平质控物的制备: 小心取出容器中上 1/3 液体到另外的容器中, 将用于低水平质控物的制备, 中间的 1/3 用于中值水平液体质控的制备, 剩下的 1/3 血清将用于高水平液体质控的制

* 基金项目: 广州市卫生局重点项目(201102A212028); 广东省科技厅课题(2010B080702018)。作者简介: 戴卉, 女, 学士, 技师, 主要从事临床免疫工作。

备。将容器中的血清分别混匀,冷冻储存(-20 ℃)1 周后,静置于 4 ℃ 解冻 24 h,小心移去各容器中 30% 的上清液,用等量 30% EG 补入,混匀,制成 30% EG 液性质控物,最后制备成高、低二水平的 30% EG 液性质控物 (AFP、CEA、CA125、CA153、CA199) 和高、中、低三水平的 30% EG 液性质控物 (CA-724、CY2-11、NSE、T-PSA、β-HCG)。将制备好的各水平质控物离心(4 000 r/min,10 min)后,以 250 μL 为单位分装到 EP 管中,于 -20 ℃ 储存。

1.4 观察指标 每日随机取 2 种或 3 种浓度水平的质控物各 1 份,取出室温静置 0.5 h,平衡至室温后,与日常标本一同上机检测,记录数据。在分析液性质控物的稳定性期间,以美国 BIO-RAD 定值冻干质控物为对照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件包和 Excel 2003 进行统计学分析,采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

将分装的自制液性质控物与日常标本一同上机检测,并对数据进行统计学分析,分别求出平均值、标准差(*SD*)、变异系数(*CV%*),并与美国 BIO-RAD 冻干质控物日常质控实测值的对比,并对各自制液性质控物分别与 BIO-RAD 质控的值得配对 *t* 检验,得出的结果差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明的自制液性质控物和 BIO-RAD 相关性良好,同时也说明了自制液性质控物的稳定性良好。见表 1、2。

表 1 自制高值和低值两水平质控与 BIO-RAD 实测值的对比 (ng/mL)

项目	高值					低值								
	均值	<i>SD</i>	<i>CV</i> (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	均值	<i>SD</i>	<i>CV</i> (%)	<i>t</i>	<i>P</i>				
AFP														
自制质控	102.86	2.75	2.66	1.681	0.107	20.94	0.60	2.88	1.721	0.131				
BIO-RAD	119.33	3.55	2.97			24.20	0.98	4.06						
CEA														
自制质控	24.17	0.79	2.66	1.814	0.212	4.01	0.12	2.99	1.698	0.131				
BIO-RAD	29.09	0.94	3.24			3.84	0.19	5.04						
CA125														
自制质控	84.70	1.19	1.40	1.958	0.331	30.77	0.98	3.18	1.854	0.261				
BIO-RAD	83.33	6.25	7.50			24.92	0.78	3.14						
CA153														
自制质控	83.66	1.30	1.55	1.756	0.124	27.80	0.82	2.95	1.799	0.179				
BIO-RAD	83.33	6.25	7.50			31.29	4.26	9.61						
CA199														
自制质控	43.34	1.12	2.58	1.801	0.202	13.68	0.49	3.55	1.812	0.206				
BIO-RAD	38.90	1.05	2.70			15.54	1.16	7.48						

表 2 自制高值、中值和低值三水平质控与 BIO-RAD 实测值的对比 (ng/mL)

项目	高值					中值					低值				
	均值	<i>SD</i>	<i>CV</i> (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	均值	<i>SD</i>	<i>CV</i> (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	均值	<i>SD</i>	<i>CV</i> (%)	<i>t</i>	<i>P</i>
CA724															
自制质控	12.22	0.61	5.00	1.728	0.117	8.52	0.40	4.74	1.752	0.121	4.21	0.24	5.77	1.725	0.117
BIO-RAD	15.10	1.60	10.60			13.88	0.87	6.31			4.60	0.48	10.33		
CA211															
自制质控	23.52	0.49	2.10	1.713	0.113	15.39	0.29	1.86	1.691	0.110	7.87	0.28	3.65	1.928	0.301
BIO-RAD	30.83	3.08	10.00			18.68	1.46	0.77			3.94	0.39	9.90		
NSE															
自制质控	34.99	1.50	4.30	1.811	0.214	8.56	0.33	3.87	1.730	0.132	2.07	0.03	1.42	1.862	0.232
BIO-RAD	22.03	2.43	11.02			10.56	6.30	7.31			1.03	0.04	3.97		
PSA															
自制质控	28.59	0.68	2.39	1.721	0.115	9.80	0.21	2.18	1.844	0.223	2.48	0.04	1.63	1.687	0.106
BIO-RAD	37.16	2.52	6.79			5.88	0.17	5.96			2.39	0.10	4.08		
β-HCG															
自制质控	34.43	4.72	3.51	1.811	0.204	20.16	0.65	3.25	1.773	0.156	6.62	0.16	2.35	1.869	0.221
BIO-RAD	140.00	6.58	4.70			19.60	1.37	7.00			6.66	0.19	2.79		

3 讨 论

在进行室内质量控制时,按照 ISO15189 的要求临床实验室一般应同时使用至少两个浓度水平的质控物。实验室则遇到的首要问题是质控物成本,尤其对肿瘤标志物质控品而言,其进口质控物成本非常昂贵;另外,如要自行配制质控物将面

临如何配制高浓度质控物的问题。通常实验室在制备高水平的质控物时需收集病情较重患者的血清,在实际工作中较难收集到足够量的血清以满足室内质控的需求。为此,本项目利用冰冻的液体物质在缓慢解冻后,其中物质浓度会产生由上至下的梯度现象,设计了制备高低两水平和高中(下转第 2561 页)

炎。在 ANCA 相关疾病性血管炎损害过程中,被活化的中性粒细胞胞浆蛋白酶可致血管内皮损伤和细胞溶解。研究表明,不同的 ANCA 类型和靶抗原往往与临床不同疾病相关^[14],其中 PR3-ANCA 与 WG 密切相关,而抗 MPO 阳性则少见,活动期的 WG 患者其 ANCA 阳性率可达 80-100%^[15],本文中 WG 活动期阳性率为 87.5%, ANCA 相关性血管炎病阳性率为 93.7%,与文献报道相同。

随着 ANCA 所识别的靶细胞抗原不断增加,与其相关的疾病也不断被发现。因此用 IIF 和免疫印迹法两种联合检测 ANCA 更加可靠、客观,同时提高 ANCA 的检出率。不同的荧光模式和不同的靶抗原对疾病诊断和鉴别及预测具有重要的意义。

参考文献

[1] kallenberg CG, Mulder AH, Teraert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders[J]. AM J Med, 1992, 93(6): 675-682.
 [2] 马洪升, 欧阳钦. 抗中性粒细胞胞浆抗体及其与溃疡性结肠炎的关系[J]. 四川医学, 1999, 20(3): 168-171.
 [3] 鲍春德. 提高抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎的诊治水平[J]. 上海医学, 2008, 31(12): 837-840.
 [4] 仲人前, 范列英. 自身抗体基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 2006: 95.
 [5] 徐三荣, 林庚金. 溃疡性结肠炎与抗中性粒细胞胞浆自身抗体[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1998, 18(3): 173-176.
 [6] 李贵玲, 郑岚, 谢凤等. 两种方法联合检测风湿性疾病中 ANCA

的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(10): 1249-1251.
 [7] 曹建平, 姜志明, 张小晨. SLE 患者血清中可溶性肿瘤坏死因子受体水平及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(4): 329-331.
 [8] 靳淑玲, 王北宁. 抗中性粒细胞胞浆抗体的检测方法及其临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(6): 599-600.
 [9] Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies(ANCA)[J]. Am J Clin Pathol, 1999, 111: 507.
 [10] Nssberger, L, Jonsson, H, Sjöhom, A G, et al. Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus[J]. Lancet, 1989, 8636: 509
 [11] 侯巍, 惠艳. 65 例系统性红斑狼疮患者抗中性粒细胞胞浆抗体的检测分析[J]. 地方病通报, 2005, 20(2): 98.
 [12] 李多孚, 任莉平. 抗中性粒细胞胞浆抗体的实验进展[J]. 陕西医学检验, 1997, 12(4): 60-62.
 [13] Leid RW, Ballieux BE, Van-der-heijden I, et al. Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(11): 2939-2944.
 [14] Gross WL, Csemok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigen, and, systemic vasculitis (Review) [J]. APMIS, 1995, 103: 81.
 [15] Rai JK, Weinberger M, Oddone EZ, et al. The role of antineutrophil cytoplasmic antibody testing in the diagnosis of Wegener's granulomatosis[J]. Annals Intern Med, 1995, 123(13): 925.

(收稿日期: 2013-02-19)

(上接第 2558 页)

低三水平质控物原料的方法,从而解决了实验室在制备中、高水平质控物时遇到的困难。与此同时,液态质控物所使用 30% EG,其价格低廉,且具有高渗和抗氧化性质,可防止细菌生长和某些被测物的氧化,还能够降低自制液态质控物的凝固点,减小了冻融对血清的影响^[8-10]。在收集血清过程中,严格按照标准进行样品收集,同时最后一步采用离心去除颗粒物的方法以确保质控物的物理性状满足中国卫生部临床检验中心对所配液性质控物的一般性状,如 pH、细菌菌落数、吸光度和基质效应等的要求。

从表 1 和 2 的数据可以看出,自制的质控血清在观察的时间范围内是稳定的。在实验中,以 BIO-RAD 冻干质控物作为参照,自制的质控血清的标准差和变异系数与 BIO-RAD 质控的实测值相近,甚至有些项目比 BIO-RAD 质控的更理想。在自制质控血清和 BIO-RAD 质控作配对 *t* 检验,差异无统计学意义,表明了两者的相关性良好,两者的 CV% 变化都在 15% 以内^[11]。从总的情况分析,自制液性质控物的标准差和变异系数是比较理想的。但要制成一种稳定的质控品,还需要进行更长时间的检测,以观察其时间稳定性。

综上所述,自制液性质控物取材于日常废旧的检测标本,成本低,稳定剂价格低廉,容易购得。因此,自制质控品可以基本替代昂贵的进口质控品,适合于各大、中医院的室内质控,也特别适合于广大的基层医院使用。

参考文献

[1] Goi G, Besozzi M, Bairati C, et al. Preparation of a stable liquid material for calibration and quality control for lysosomal enzymes

in plasma. Assay of enzymes of lysosomal origin in plasma, I [J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992, 30(10): 595-598.
 [2] 许凯声, 杨志刚. 自制全血质控物在室内质控中的运用[J]. 浙江医科大学学报, 1998, 27(5): 231-233.
 [3] 赵令君. 自制高、中、低浓度质控血清在甲状腺激素放免分析质控中的应用[J]. 长春医学, 2006, 4(2): 11-13.
 [4] 林增文, 欧佩兰. 液态质控血清制备的探讨[J]. 陕西医学检验, 2000, 15(2): 47-48.
 [5] 马德均, 刘福成. 稳定的液态质控血清制备法[J]. 临床检验杂志, 1988, 6(3): 165-169.
 [6] 何思春, 王利君, 焦鑫. 质控血清冷冻保存对电化学发光测定甲状腺激素的影响[J]. 检验医学, 2010(04): 321-322.
 [7] 段勇, 王玉明, 赵滢, 等. 临床化学检验的液性质控血清的制备研究[J]. 昆明医学院学报, 2003, 24(2): 24-27.
 [8] Piironen T, Pettersson K, Suonpaa M, et al. In vitro stability of free prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific antigen (PSA) complexed to alpha 1-antichymotrypsin in blood samples [J]. Urology, 1996, 48(6A Suppl): S81-87.
 [9] Masse J, Forest J C, Moutquin J M, et al. Effect of repeated freeze-thaw cycles on maternal serum biological markers for the detection of fetal trisomies [J]. Clin Biochem, 1997, 30(7): 527-530.
 [10] 高云朝, 顾建英, 陆汉魁, 等. 血清反复冻融对肿瘤标志物浓度的影响[J]. 中国实验诊断学, 2007(01): 119-120.
 [11] Wilson J F. Survey of reference ranges and clinical measurements for psychoactive drugs in serum [J]. Ther Drug Monit, 2003, 25(2): 243-247.

(收稿日期: 2013-06-17)